基于 *amy* 基因的中国野桑蚕遗传多样性及其与家蚕的系统发育关系

杜周和[1,2], 刘俊凤[2], 刘斌彬[2], 董占鹏[1,3], 余泉友[4], 鲁 成[1,*], 陈义安[2]

(1. 西南大学蚕学与系统生物学研究所, 重庆 400716; 2. 四川省农业科学院蚕业研究所, 四川南充 637000; 3. 云南省农业科学院蚕蜂研究所, 云南蒙自 661101; 4. 重庆大学农学院, 重庆 400030)

摘要: 为探索中国野桑蚕 *Bombyx mandarina* 的遗传多样性及其与家蚕 *B. mori* 的系统发育关系, 采用 PCR 产物直接测序法(少数样本克隆测序)获得 34 个家蚕和野桑蚕样本淀粉酶基因 *amy* 序列片段(715 bp)。分析发现 56 个多态性位点, 鉴定出 28 种单倍型(haplotype); 核苷酸多样性 $\pi = 0.01390 \pm 0.00103$, 单倍型多样度 $Hd = 0.988 \pm 0.011$。核苷酸不配对分析(mismatch analysis)和 Fu's *Fs* 检测表明中国野桑蚕曾发生过种群扩张。分子方差分析(AMOVA)表明, 遗野桑蚕传差异主要在种群内, 种群间和地理组群间差异不显著。聚类树上 34 个样本聚为 3 枝/3 簇, 野蚕和家蚕都不按地理区域或系统(类型)聚类, A 枝由来自不同地区的野蚕和不同类型的家蚕混合构成, 并且进一步分成 3 个亚枝, 每一亚枝也同时包含家蚕和野蚕, B 枝由 3 个家蚕和 1 个野蚕混合构成, C 枝全部由来自不同地区的野蚕构成。网络分析没有发现"祖先单倍型"和优势单倍型。结果提示, 淀粉酶基因是一个多态性丰富的分子标记, 中国野桑蚕遗传多样性十分丰富, 据此推测家蚕起源于多种生态类型混杂的野桑蚕。

关键词: 家蚕; 野桑蚕; 遗传多样性; 系统发育; 淀粉酶基因

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2009)12-1338-11

Genetic diversity of the wild mulberry silkworm, *Bombyx mandarina*, in China and its phylogenetic relationship with the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, based on *amy* gene

DU Zhou-He[1,2], LIU Jun-Feng[2], LIU Bin-Bin[2], DONG Zhan-Peng[1,3], YU Quan-You[4], LU Cheng[1,*], CHEN Yi-An[2] (1. Institute of Sericulture and System Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Institute of Sericulture, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. Sericultural and Apicultural Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi, Yunnan 661101, China; 4. College of Agricultural Sciences, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Polymerase chain reaction and PCR products directly sequencing method (a few samples sequenced by cloning) were used to analyze the genetic diversity of the wild mulberry silkworm, *Bombyx mandarina* in China and the phylogeny of the domesticated silkworm, *B. mori*. A total of 715 bp nucleotides of partial amylase gene *amy* were sequenced in thirty-four samples from three groups of *B. mandarina* and four types of *B. mori*. Fifty-six polymorphic sites, including 28 singleton variable sites and 28 parsimony informative sites, defined 28 haplotypes. The nucleotides diversity (π) was 0.01390 ± 0.00103 and the haplotype diversity (*Hd*) was 0.988 ± 0.011. Mismatch analysis and Fu's *Fs* test revealed the population expansion of *B. mori* in the past. Analysis of molecular variance (AMOVA) suggested that genetic variance mostly existed within populations and accounted for 82.63% of total variation. Variance between population and population-groups was not significant. The phylogenetic analysis indicated that three clusters were formed by the thirty-four samples analyzed. Cluster A consisted of *B. mandarina* from different regions and *B. mori* from different types, which

基金项目: 教育部博士点专项基金(20040625009); 国家重点基础研究发展规划("973"计划)项目(2005CB121000)

作者简介: 杜周和, 男, 1968 年生, 四川南充人, 博士, 副研究员, 主要从事蚕的遗传资源与分子生物学研究, Tel.: 0817-2232576; E-mail: zhouhedu@263.net

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 023-68250346; E-mail: lucheng@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2009-07-28; 接受日期 Accepted: 2009-10-19

was further divided into three sub-clusters. Cluster B consisted of three *B. mori* and one *B. mandarina*, while cluster C consisted of *B. mandarina* from different regions only. There is no ancestor haplotype and dominant haplotype in the median-joining network. The results suggest that: (1) the *amy* gene is a molecular marker with rich diversity in silkworms; (2) there is great genetic diversity within *B. mandarina* population in China; and (3) the domesticated silkworm may be domesticated from multi-typed *B. mandarina*, which supports the theory of multiple origins from a variety of *B. mandarina*.
Key words: Domesticated silkworm (*Bombyx mori*); wild mulberry silkworm (*B. mandarina*); genetic diversity; phylogeny; amylase gene (*amy*)

家蚕 *Bombyx mori* 是鳞翅目中最重要的一种经济昆虫。关于家蚕起源与分化的科学问题，近一个世纪以来，中外学者从生态学、地理学、血清学、细胞学、古生物学、遗传学、考古学、历史学、古气候学等方面进行了广泛的探索(Yoshitake, 1966; 蒋猷龙, 1982; 段佑云, 1983; 吉武成美和蒋猷龙, 1987; 郭郛, 1987)。上世纪 90 年代后期，又开始用分子生物学技术从 DNA 水平进行了深入研究(夏庆友等, 1998; 万春玲等, 1999; 余红仕等, 2000; 鲁成等, 2002a; 李爱玲等, 2004; 陈丽媛等, 2007)。最近，Xia 等(2009)基于全基因组水平的研究发现了人工驯化对家蚕生物学影响的基因组印记，揭示出“化性”并不能完全反映家蚕的起源驯化特征。纵观百年研究，比较一致的观点是：家蚕起源于中国野桑蚕 *Bombyx mandarina*，至今有 5 000 ~6 000 年历史(蒋猷龙, 1982; 周匡明, 1982; 李焕文, 1985; 吉武成美和蒋猷龙, 1987; Arunkumar *et al.*, 2006)。家蚕有中国系统、日本系统、欧洲系统和热带系统四大系统，各系统又分化出一化种、二化种、有滞育多化种以及无滞育多化种等多种生态类型。家蚕最早从中国的什么地方开始驯化，驯化之初的状态如何，驯化之后又如何分化，这些问题一直存在争论，主要有 Yoshitake(1966)的“一化一中心”学说、蒋猷龙(1989)的“多化多中心”学说及鲁成(2002a)提出的“混化性起源”等 3 种观点。

野桑蚕 *B. mandarina* 是家蚕的直系祖先，是家蚕起源分化研究的基础材料，同时又是极其宝贵的基因资源，对家蚕遗传育种、特殊性状基因库的建立与应用具有重要意义。我国幅员辽阔，地理、气候类型丰富，野桑蚕分布极其广泛，各地野蚕各具特色。迄今已对野桑蚕在数量性状(杨希哲等, 1984)、生活习性(郑声镛, 1992; 华德公, 1996)、同工酶(Yoshitake, 1966)和染色体(李振刚和吴秋英, 1983)方面与家蚕的亲缘关系，及其在家蚕育种上的利用(杨鹤楼, 1982; 彭卫平, 1987)等进行了研究。但利用分子生物学方法，从 DNA 序列水平探讨野桑蚕的遗传多样性及其分化等问题，目前还鲜有系统研究，对野桑蚕的多样性知之甚少，以致于之前几乎所有研究都将野桑蚕作为一个相同参照，各地只采集当地野桑蚕作为材料，甚至在与家蚕比较时均视为相同的野桑蚕(鲁成等, 2002d)。然而，从野桑蚕起源而来的家蚕尚有多种地理系统和生态类型，彼此之间存在相当大的遗传差异，野桑蚕起源进化时间较家蚕要早很多，各地野桑蚕间应有很大的遗传差异(夏庆友等,1998; 鲁成等, 2002a)。

本研究采集不同地理、气候条件的野桑蚕和不同生态类型的家蚕，以淀粉酶(amylase)基因 *amy* 为标记，用 DNA 序列分析(DNA sequence analysis)技术研究中国野桑蚕的遗传多样性、种群结构及其与家蚕的系统发生关系，为家蚕起源分化研究和野桑蚕基因资源的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试虫

从不同生态地区收集野桑蚕，按地貌特征和空间距离分为西南(XN)，华中(HZ)和华东(HD)3 大地理种群(表 1)。家蚕包括 4 大系统(中系，日系，欧系和热带种)的 9 种生态类型(中系一化三眠，中系一化四眠，中系二化，中系多化; 日系一化，日系二化; 欧系一化，欧系二化及热带种)，分别由中国蚕研所，四川蚕研所，浙江蚕研所，广东蚕研所和西南大学家蚕基因库提供(表 1)。

1.2 总 DNA 的提取

野桑蚕野外采集后室内饲养至化蛹，家蚕常规桑叶育饲养至化蛹。以蛹为材料，参照夏庆友等(1998)的方法稍作改进，以单个蛹提取总 DNA。电泳检测后，用 Bio-Rad Smart Spec™ 3000 分光光度计测定浓度，保证 DNA 纯度 A260/280 = 1.8 左右。高压灭菌双蒸水稀释至 20 ng/μL, −20℃保存备用。

表 1 本研究使用样本信息

Table 1 Data of samples used in this study

地理组群 Geographic group	代码 Code	品种 Strain	来源/产地 Source/locality	系统/特征 System/character	单倍型 Haplotype
家蚕 *Bombyx mori*	JC	姬蚕 JC	江苏镇江 Zhenjiang, Jiangsu	日系一化 Japanese V1	H16
		琼十 QS	广东 Guangdong	中系多化 Chinese Vd	H16
		土种 01 TZ01	四川 Sichuan	中系一化 Chinese V1	H21
		C108 C108	日本 Japan	中系二化 Chinese V2	H21
		大造 DZ	广东 Guangdong	热带二化 Tropical V2	H12
		春四 CS	广东 Guangdong	日系二化 Japanese V2	H19
		法 408 F408	欧洲 Europe	欧系一化 European V1	H20
		温州种 WZZ	浙江 Zhejiang	中系一化 Chinese V1	H10
		乌 D WD	欧洲 Europe	欧系二化 European V2	H17
西南野蚕 Xinan *B. mandarina*	XN	青木关野蚕 QMG1, QMG2, QMG3, QMG4	重庆青木关 Qingmuguan, Chongqing	野蚕 *B. mandarina*	H1, H3, H6, H26
		荣昌野蚕 RC1, RC2	重庆荣昌 Rongchang, Chongqing	野蚕 *B. mandarina*	H3, H14
		南充野蚕 NC1, NC2, NC3	四川南充 Nanchong, Sichuan	野蚕 *B. mandarina*	H11, H12, H13
		安康野蚕 AK1, AK2, AK3	陕西安康 Ankang, Shaanxi	野蚕 *B. mandarina*	H7, H23, H27
		云南野蚕 YN1	云南祥云 Xiangyun, Yunnan	野蚕 *B. mandarina*	H4
华中野蚕 Huazhong *B. mandarina*	HZ	湖南野蚕 HN1, HN2, HN3, HN4	湖南澧县 Lixian, Hunan	野蚕 *B. mandarina*	H8, H21, H28
华东野蚕 Huadong *B. mandarina*	HD	合肥野蚕 HF1, HF2	安徽合肥 Hefei, Anhui	野蚕 *B. mandarina*	H15, H18
		浒墅关野蚕 XSG1, XSG2, XSG3	江苏浒墅关 Xushuguan, Jiangsu	野蚕 *B. mandarina*	H9, H24, H25
		镇江野蚕 ZJ 1	江苏镇江 Zhenjiang, Jiangsu	野蚕 *B. mandarina*	H2
		苏州野蚕 SZ1	江苏苏州 Suzhou, Jiangsu	野蚕 *B. mandarina*	H22
		山东 SD1	山东平渡 Pingdu, Shandong	野蚕 *B. mandarina*	H5

1.3　引物设计与 PCR 扩增

家蚕淀粉酶基因是一个多基因家族，以家蚕淀粉酶基因 *Bmamy2*（NCBI 登录号：EU856718）序列为模板设计引物。基因全长 6 233 bp，含 8 个内含子，CDS 1 752 bp，编码 583 aa，预备实验检测到图 2 所示的扩增区段具有较高的碱基突变率。试验野蚕来自不同地区，家蚕来自不同系统，遗传背景差异较大，引物结合位点可能存在碱基突变，为避免突变影响 PCR 扩增，同时设计 2 对引物备用。引物在基因中的位置如图 1 所示。引物序列如下：

P1（F：5′-CCATTGGCACAAAATAGAGAG-3′，R：5′-CGACATTGAGGGTTTCATAGC-3′）；

P2（F：5′-GACATTGAGGGTTTCATAGCC-3′，R：5′-TCTACACAAAAGACCACGAAG-3′）。

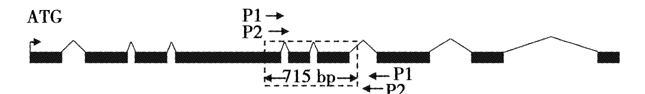


图 1　家蚕 *Bmamy2* 基因结构与 PCR 扩增片段位点

Fig. 1 Schematic representation of *Bmamy2* gene structure and the PCR amplified fragment

虚线框中为后续分析所用序列 Sequence in the dotted frame was used for the further analysis.

PCR 反应体系：ddH_2O 15.8 μL，10 × Buffer 2.5 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μL，2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL，20 pmol/μL Primer（F + R）1.0 μL，5U/μL Taq 0.2 μL，20 ng/μL DNA 模板 2.0 μL，TotaL 25 μL。

PCR 反应程序：94℃ 预变性 4 min；94℃ 30 s，52℃ 30 s，72℃ 90 s，循环 35 次；72℃ 延伸 10 min。

1.4　序列测定

PCR 扩增产物用 Tiangen 胶回收试剂盒纯化回收，回收片段送大连 TaKaRa 公司测序。PCR 产物不能完成测序的片段连接到 PMD18-T 载体，转化 DH5α 大肠杆菌后鉴定出阳性克隆，重组质粒送上海 Invitrogen 公司测序。

1.5　序列分析

双向测序获得的序列用 Chromas 程序逐条人工校对排除机读误差，以 DNASTAR 中的 SeqMan 拼接序列。Clustal X（Thompson *et al.*，1997）进行序列对位排列，UltraEdit 32 提取长度为 715 bp 的序列用于后续分析。BioEdit 统计碱基组成和核苷酸替换分析，DnaSP4.0（Rozas *et al.*，2003）检测单倍型和多态性位点，计算核苷酸多样性（π）和单倍型多样度（*Hd*）。分别用 MEGA4（Tamura *et al.*，2007）、PHYLIP3.65 和 PAUP4.0b10（Swofford，2002）构建邻接树（neighbor-joining，NJ）、最大似然树（maximum likelihood，ML）、最大简约树（maximum parsimony，MP）检验进化树拓扑结构稳定性，自举检验（bootstrap）（Felsenstein，1985）估计进化树节点置信值。Network4.5（Bandelt *et al.*，1999）构建中介网络图（median-joining network）调查单倍型间的进化关系。Arlequin3.1（Laurent *et al.*，2006）进行 Fu's *Fs* 检验（Fu，1997）、核苷酸不配对分析（mismatch analysis）（Schneider *et al.*，1999）和分子方差分析（analysis of molecular variance，AMOVA）（Excoffier *et al.*，2000）检验种群扩张和群体分化结构。

2　结果

2.1　种群序列变异和单倍型分析

试验选用 25 个野蚕样本和 9 个家蚕样本。选取测序质量好的 DNA 区段进行分析（图 2 虚线框所示，片段长 715 bp，包含 2 个完整的外显子、2 个完整的内含子、1 个外显子片段和 1 个内含子片段）。25 个野蚕中共鉴定出 23 种单倍型，单倍型比率 92.0%（仅 H3 和 H8 是共享单倍型，独享单倍型比例 91.30%），单倍型多样度 *Hd* = 0.993。变异位点（variable site）51 个，变异位点比率 7.1%，其中简约信息位点（parsimony information site）25 个，变异比率 3.5%；核苷酸多样性 π = 0.01474。无论是核苷酸变异比率、单倍型比率、单倍型多样度还是核苷酸多样性，各地野蚕都不一样，其中以华东野蚕较大。9 个家蚕中鉴定出 7 种单倍型，单倍型比率 77.8%（其中 H16 是共享单倍型，独享单倍型比例 71.43%），单倍型多样度 *Hd* = 0.944。变异位点 19 个，变异位点比率 2.7%，其中简约信息位点 10 个，变异比率 1.4%；核苷酸多样性 π = 0.00944。家蚕的各项指标均低于野蚕。家蚕和野蚕整体分析，变异位点比率 7.8%，简约信息位点变异比率 3.9%；单倍型比率 82.35%，单倍型多样度 *Hd* = 0.988，核苷酸多样性 π = 0.01390；H12 和 H21 是家蚕和野蚕共享单倍型，共享比率 7.14%（详见表 1、表 2）。总体而言，无论家蚕还是野蚕，*Hd* 和 π 值都较高，拥有较高的遗传多态性。

表 2　家蚕和野蚕淀粉酶基因核苷酸序列变异位点及遗传多样性

Table 2 Variable sites and genetic diversity of nucleotide sequences of *amy* gene of *Bombyx mandarina* and *B. mori*

地理组群 Geographic group	样本数 Number of samples	变异位点 Variable site	简约位点 Parsimony information site	单倍型数 Haplotype	单倍型多样性 Haplotype diversity (*Hd*)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity (π)	*Fs*
西南野蚕 Xinan *B. mandarina*	13	26(3.6)	19(2.7)	12	0.987 ±0.035	0.01322 ±0.00105	-3.755
华中野蚕 Huazhong *B. mandarina*	4	20(2.8)	4(0.6)	3	0.833 ±0.222	0.01500 ±0.00487	2.733
华东野蚕 Huadong *B. mandarina*	8	32(4.5)	9(1.3)	8	1.000 ±0.063	0.01439 ±0.00188	-2.130
全部野蚕 Total *B. mandarina*	25	51(7.1)	25(3.5)	23	0.993 ±0.013	0.01474 ±0.00117	-11.635
全部家蚕 Total *B. mori*	9	19(2.7)	10(1.4)	7	0.944 ±0.070	0.00944 ±0.00131	-0.560
野蚕和家蚕 *B. mandarina* & *B. mori*	34	56(7.8)	28(3.9)	28	0.988 ±0.011	0.01390 ±0.00103	-13.528

括号中数字为百分比 The figure in the brackets is presented as the percentage.

进一步分析突变碱基的分布位点和突变类型，在25个野蚕样本715 bp的多序列中284，285，286，698和714位5个位点发生碱基插入/缺失，3个位点均位于内含子区域。位于284，285，286的3个T，A，T插入发生在西南野桑蚕的两个样本中（QMG1和RC1）。华东野蚕ZJ1在698位缺失1个T。2个华中野蚕（HN1和HN2），3个华东野蚕（XSG2，XSG3和HF2）同时在714位缺失1个T。碱基插入/缺失表现出明显的偏好性（5个中4个为T，1个为A）。对全部34个试验样本（包括家蚕和野蚕）整体分析（不考虑碱基插入/缺失），56个变异位点中简约信息位点28个，单个变异位点28个；3个位点（273，279，305）存在3种核苷酸，3个位点均位于第一内含子内；53个位点只有两种核苷酸存在。在305位点，来自华东地区的两个野蚕一个发生T↔A颠换（XSG2），一个发生T↔G颠换（XSG3）；在273位QM4发生C↔A颠换，QM1，QM3，YN1，RC1发生C↔T转换，5个样本均来自西南地区。第一内含子内的第279位是一个突变高发位点，A↔G转换和A↔T颠换都高频发生（表3）。

34个样本的碱基组成分析，A，T，C和G含量分别为29.75%，31.88%，16.43%和21.94%；A+T含量61.63%，C+G含量38.37%，所分析的该段序列中没有明显的碱基使用偏好。把34个样本分成家蚕和野蚕两组分别统计碱基组成，结果与样本总体的碱基组成相似。

2.2　进化枝结构及其地理分布

基于*amy*基因715 bp序列片段（包括外显子和内含子），用MEGA4中Kimura双参数模型构建无根NJ树，34个样本首先分为A，B和C 3枝，A枝再分成Ⅰ，Ⅱ和Ⅲ 3簇（图2），以CDS序列建树，得到相似的拓扑结构，PHYLIP(ML)和PAUP(MP)检验树形结构稳定。A，B两枝均由野蚕和家蚕共同组成，C枝只有野蚕，没有家蚕；Ⅰ，Ⅱ和Ⅲ 3簇也全部由家蚕和野蚕组成。25个野蚕分别来自全国11个地区，按空间距离和地貌特征分为西南野蚕（XN），华中野蚕（HZ），华东野蚕（HD）3个地理种群；家蚕包括4大系统9种生态类型（表1）。这些样本虽然按系统类型或地理区域收取样本，但其在进化枝结构中不能按系统类型或地理区域聚类。不同地区的野蚕之间、不同系统的家蚕之间出现交叉聚类，家蚕和野蚕之间也出现交叉。9个家蚕中，热带二化种"大造"单独分布在A(Ⅱ)，中系一化种"温州种"单独分布在A(Ⅲ)，其余7个种分别分布于A(Ⅰ)和B。A(Ⅰ)中的4个家蚕分别来自中系一化，中系二化，欧洲一化和日系二化；B中的3个家蚕分别来自欧洲二化，日系一化和中系多化。25个野蚕在A，B，C 3枝及Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ 3簇都有分布，B枝较少，只有1个。野蚕并不按空间距离的远近聚类，来自同一地区的野蚕分别聚在不同的枝（簇），表现出较远的亲缘关系；而来自不同地区的野蚕却聚在一起，表现出较近的亲缘关系。A(Ⅰ)，A(Ⅲ)和C中的野蚕都来源于XN，HZ和HD 3个地区，A(Ⅱ)野蚕来源于XN和HD。

表 3　实验野蚕和家蚕淀粉酶基因测序区段碱基替换位置

Table 3 Sites of base pair substitutions in the sequenced partial segments of *amy* gene of *Bombyx mori* and *B. mandarina* used in this study

碱基替换位置 Site of base pair substitution	1	2	22	27	99	105	124	135	138	144	159	180	186	189	222	228	233	263	273	275	279	280	284	285	286	287	289	290	303	305	307	326	371	390	423	424	428	443	462	479	482	483	485	491	511	523	538	589	606	616	625	643	651	672	697	698	709	710	712	713	714
QMG3	C	A	G	C	T	T	G	A	C	C	T	T	A	T	G	T	T	G	T	T	A	A	..	..	..	C	G	T	G	T	A	A	T	T	T	G	C	T	C	A	T	G	C	T	C	A	C	T	T	C	C	C	A	G	T	T	T	T	G	T	T
ZJ1																	A	C																					G															G	..	A		T	G	
QMG1				T									G				A			G		T	A	T	T					T																								G					
RC1				T									G				A			G		T	A	T	T					T																								G					
YN1				T									G				A			G						T		T		T	C						C													T				G					
SD1													G			G	A	A	C									T						C	A				G	A					G			C						G					
QMG2													G			G	A	A	C									T						C					G	A								C						G					
AK3													G			G	A	A	C									T											G	A								C						G					
HN1													G			G	A	A	C									T						C					G	A								C	T	T	T	C		G						--
HN2													G			G	A	A	C									T						C					G	A								C	T	T	T	C		G						--
XSG3																G	A	A	C		T								T	G					C					G	A								C	T	T				G						--
WZZ				T		T							G			G	A	A	C									T						C					G	A							A							G					
NC1					C						A		G			G	A	A	C									T						C					G															G					
DZ				T							A		G			G	A	A	C									T								C																			G					
NC3				T							A		G			G	A	A	C									T								C																			G					
NC2				T							A		G			G	A	A	C									T								C															T				G					
RC2				T							A					G	A	A	C									T								C														T					G					
HF2				T												G	A	A	C									T						C																			G						--
JC				T															A	C	C		C						C								C													C							G					
QS				T															A	C	C		C						C								C													C							G					
WD				T							A							A	C	C		C						C	T						C													C							G					
HF1													G			G	A	A	C	C		C						C								C									T										G					
CS	A	C		T									G			G	A	A	C		T								T				C		C														C							G					
F408				T									G			G	A	A	C		T								T						C		A											C							G					
TZ01				T									G			G	A	A	C		T								T						C															C							G					
HN4				T									G			G	A	A	C		T								T						C															C							G					
C108				T									G			G	A	A	C		T								T						C															C							G					
SZ1			C		C				T			A	G			G	A	A	C									T											A															G			C		
AK1													G			G	A	A	C		T								T											A															G					
XSG2								C					G			G	A	A	C									T	A					C				A						T	G	T		C						G						--
XSG1																G	A	A	C									T						C															C						C	G					
QMG4															G	A	G	A	A	A		G										T			C	C					G															G					
AK2				T										G	A	G	A	A	C		T								T				C	C					G	A														G					
HN3										T				G	A			A	C									T											G	A	C	A	C	T	G			C						G					

“--”表示碱基缺失 Dotted line refers to deleted bases；下划线碱基表示内含子区域 Underlined bases belong to introns.

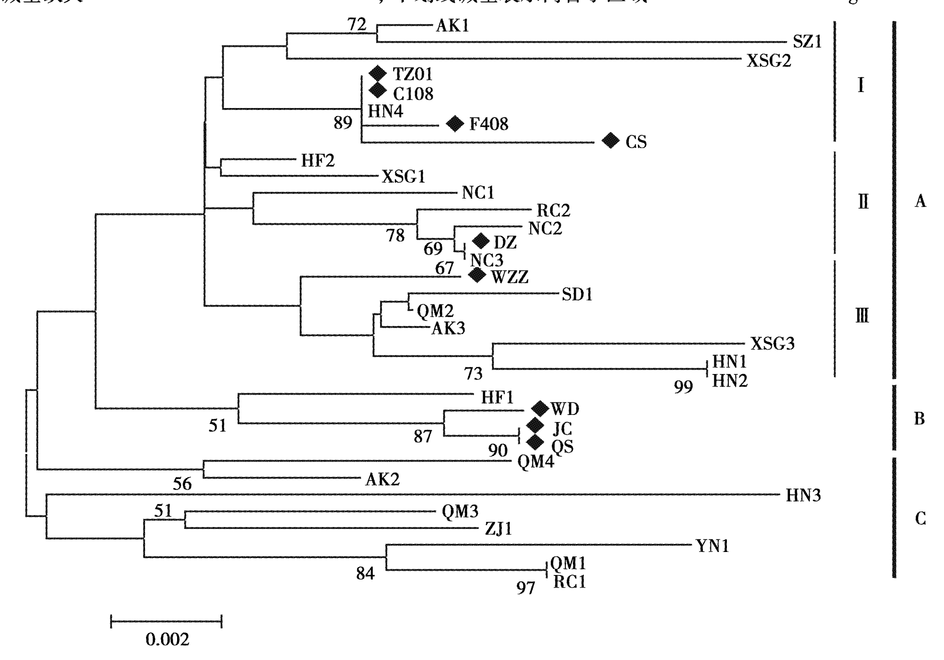


图 2　基于 34 个家蚕和野桑蚕样本的无根 NJ 树

Fig. 2 Unrooted NJ tree based on 34 samples of *Bombyx mori* and *B. mandarina*

黑色棱形指示家蚕；MEGA4.0 建树，*p*-距离，成对删除 gap，1 000 次重复，节点显示 >40% 的自展值。Domesticated silkworm is represented as black rhombus. Nucleotide *p*-distance model and pairwise deletion of gaps were selected for the tree reconstruction in the program MEGA4.0. Bootstrap values (1 000 replicates) >40% are shown.

2.3 单倍型网络结构分析

在34个样本中共检测出28种单倍型(表1,图3),其中25个野蚕分享22种单倍型,9个家蚕品种分享7种单倍型。有两种单倍型(H12和H21)为家蚕和野蚕共享,两种单倍型(H16和H21)分别为2个不同生态类型的家蚕共享,另外两种单倍型(H3和H8)分别为2个不同地区的野蚕所共享。4个华中野蚕分享3种单倍型(H8,H21和H28),其中1个与另外3个存在很大的序列差异,而有两个则完全相同,共享同一种单倍型(H8)。在28种单倍型中有23种为独享单倍型,没有一种是高频分布的优势单倍型(最高频率仅8.8%),表现出试验材料较大的遗传差异。28种单倍型聚为3群,每群都由来自不同地区(生态类型)的样本混合组成。

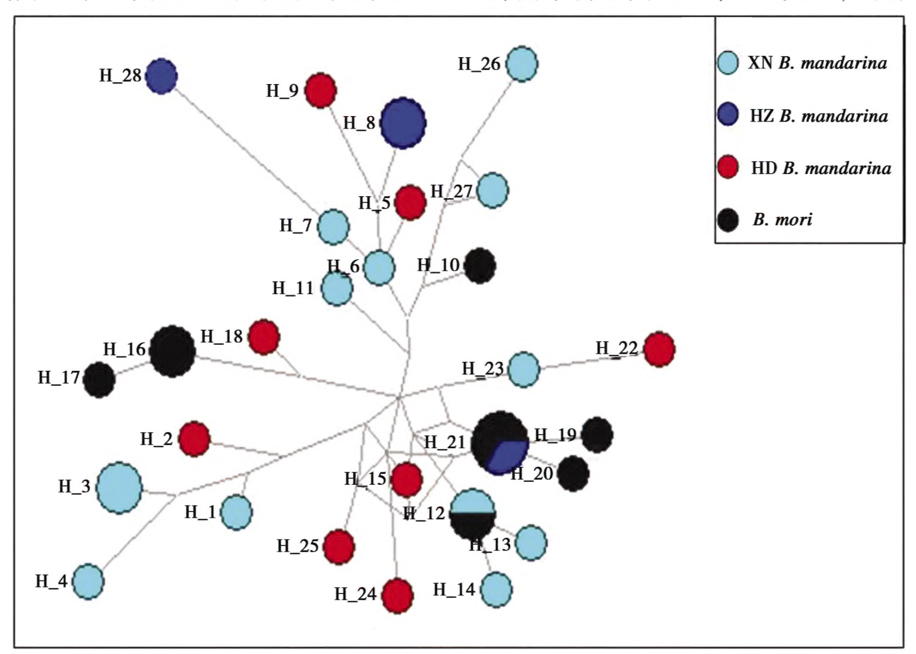


图3 家蚕和野桑蚕28种单倍型网络图

Fig. 3 Network profiles of 28 haplotypes of *Bombyx mori* and *B. mandarina*

2.4 分子方差分析

25个野蚕样本分别来自全国11个不同地区,按空间距离和地貌特征分成3个地理组群,即西南组群(XN)、华中组群(HZ)和华东组群(HD)。AMOVA分析显示,遗传差异主要来自种群内,占82.63%($P<0.01$),地理组群间和组群内都不明显,分别只有5.93%($P>0.05$)和11.44%($P>0.05$),表明中国野桑蚕不存在明显的地理组群结构。

表4 野桑蚕 *amy* 基因的分子变异分析

Table 4 AMOVA of *amy* gene of *Bombyx mandarina*

变异来源 Source of variance	自由度 *df*	方差分量 Variance components	变异百分比 Percentage of variance	*P* 值 *P* value
地理组群间 Among geographic groups	2	0.34664	5.93	>0.05
地理组群内 Among populations within geographic group	8	0.66907	11.44	>0.05
种群内 Within population	14	4.83333	82.63	<0.01

2.5 种群扩张及多样性分析

通常有两种方法检验种群在历史上是否发生过扩张,一是采用Fu'S *Fs* 检验,负的 *Fs* 值和差异显著的 *P* 值被认为种群有扩张迹象。另一种方法是核苷酸不配对分析,种群扩张导致核苷酸不配对分布呈单峰曲线。由表2可知野蚕种群的整体 *Fs* =

-11.635（$P<0.01$），核苷酸不配对分布（distribution of mismtach）呈单峰（图略），说明野蚕在历史上可能发生过种群扩张。再分群体（XN，HZ及HD）的 *Fs* 值为正或很小的负值，且 $P>0.1$，表明再分群体没有种群扩张，同时也得到核苷酸不配对分析的支持（图略）。

3　讨论

3.1　基因多态性

研究近缘生物间的亲缘关系，分辨力低的形态标记往往难以奏效，需要快速进化的、以遗传物质本身为基础的直接的遗传标记。从上世纪末至本世纪初，人们用 AFLP，RAPD，RFLP 和 SSR 等多种分子标记对家蚕的系统发育关系进行了广泛的研究，取得重要成果。本世纪初，随着 DNA 测序技术的进步，DNA 序列分析技术被广泛应用于生物进化研究。DNA 序列分析技术通过测定核酸一级结构中核苷酸顺序来比较同源分子之间的相关性，碱基的插入、缺失、转换、颠换、倒位、易位、重复和重排等都能够通过 DNA 测序发现，因此 DNA 序列分析已成为目前分子进化及系统发育研究最有效、最可靠的方法。目前，基于线粒体基因对家蚕亲缘关系的研究已较多，而利用核基因组功能基因的研究还鲜有报道。因此，本试验选择淀粉酶基因 *amy* 作标记，用 DNA 序列分析技术进行研究。结果表明：在长度为 715 bp 的 DNA 片段中，碱基多态性高达7.1%（野蚕）和 2.7%（家蚕），没有明显的碱基使用偏好，平均 A+T 含量 61% 左右，能用 PCR 产物直接测序，操作简便，易于完成较大样本的测序研究。

3.2　中国野桑蚕的遗传多样性

25 个野蚕中发现 23 种单倍型，单倍型比率 92%（其中 21 种为独享单倍型，独享单倍型比率 91.30%），单倍型多样度 $Hd=0.993\pm0.013$，核苷酸多样性 $\pi=0.01474\pm0.00117$，DNA 序列多态性位点比率高达 7.1% 以上，网络图中没有一种高频分布的优势单倍型（最高频率仅 8.8%），多种指标一致表明中国野桑蚕遗传多样性十分丰富。核苷酸多样性（π）是衡量群体多态程度的重要指标，π 越大，群体多样性程度越高。从表 2 可以看出，π 野蚕 > π 家蚕，虽然家蚕在欧亚各国经历了几千年强烈的驯化选择，形成了形形色色的多种系统和类型，但野蚕仍比家蚕具有更高的多样性。鲁成等（2002b）用 AFLP 标记也检测到同一地区野桑蚕个体间的遗传距离甚至超过家蚕品种间的遗传距离。野蚕的多样性是长期的自然选择、适者生存的结果。野蚕的生态学特征之一是群体发育极不整齐，典型的现象是越年卵孵化的长期化和蛹期发育的多样化，发育早的已完成一个世代，而发育迟的尚未出壳，造成世代重迭。野蚕发育的多样化不仅是度过不良环境的一种手段，也是维持杂种优势的一种机制。同一蛾区越年卵孵化的长期化，有避免兄妹交配的效果；同世代的蛹有的滞育，有的不滞育，滞育蛹的羽化期从同世代群体中脱离出来，与其他世代个体的羽化期重合，这样降低了同系统内近亲交配的概率，增加了异系统间杂交的机会，从而有效地避免了种群的退化，提高了生存能力（沈卫德等，2001）。

3.3　野桑蚕的地理分布与种群分化

野桑蚕广泛分布在包括中国、日本、朝鲜、韩国、印度和俄罗斯等在内的东亚地区（李瑞，1986），尤其在中国分布范围更广（李茂贞，1991），以前认为云贵高原没有野桑蚕（段佑云，1983），现在云南也发现野桑蚕。核苷酸不配对分布成明显的单峰，Fu's *Fs* 检验得到较大的负值（$Fs=-11.635$）和显著的 P 值（$P<0.01$），推测中国野桑蚕曾发生过明显的种群扩张事件（Fu，1997；Schneider *et al.*，1999）。野桑桑蚕分布广泛，各地是多种生态类型（包括多种化性和眠性）混杂的群体（黄尔田，1985；沈永泉和姚友根，1986；沈卫德等，2001），后来由于某种地质气候变化，桑树在许多地方消失，形成相互隔离的区域性分布。由于野桑蚕的寡食性，桑树消失的地方野桑蚕随之消失（网络图中的媒点代表已经消失或未取到样的野蚕类型），各隔离区内幸存的野桑蚕继续保持以前的混杂性。推测这种隔离分布是比较晚近的事件，短期的进化还未湮灭曾经混杂的痕迹，所以还能检测到空间相隔较远的野桑蚕聚类在一起，而同一地区的野桑蚕聚类在不同枝的现象。分子方差分析（AMOVA）检测到野桑蚕的多样性主要来自种群内，地理组群间和地理组群内差异都不显著，表明野桑蚕地理种群结构不明显，支持隔离分布是晚近事件的推论。山羊（Chen *et al.*，2005）、鸡（Liu *et al.*，2006）等其他物种也发现非常类似的地方种群混杂聚类现象。

3.4　家蚕的起源与分化

家蚕起源于中国野桑蚕已得到中外学者的公认，但在驯化地点和起源类型上存在分歧，主要的有“一化性起源”、“多化性起源”以及“多种化性起

源"3 种观点(吉武成美, 1966; 蒋猷龙, 1982; 鲁成等, 2002a)。夏庆友等(2009)基于全基因组水平的研究揭示出"化性"并不能完全反映家蚕的起源驯化特征。本研究中, 9 个家蚕来自 4 大地理系统的 9 种生态类型, 野桑蚕来自全国不同地区, 进化树分成 A, B 和 C 3 枝, A 枝再分为Ⅰ, Ⅱ和Ⅲ 3 簇, 大部分枝(簇)都包含来自不同地区的野桑蚕和不同系统及生态类型的家蚕。不同系统/类型的家蚕聚在一起, 是由于人工驯化的强烈定向选择所致; 同是家蚕却分布在不同的进化枝上, 可能的原因是不同家蚕在驯化选择过程中承受的选择目标和方向不一样, 导致遗传分化。聚在一枝的家蚕由不同的系统/类型组成, 推测家蚕是从多种化性和眠性混杂的野蚕驯化而来。考虑到野桑蚕混杂分布的自然生存状态, 而驯化之初的先民对其化性和眠性特征知之不多, 因而将其笼统抓来驯养的可能性比特别针对某种特殊化性类型进行驯养的可能性更大。本研究支持鲁成等(2002a)提出的"多种化性起源"观点。

致谢 中国农业科学院蚕业研究所徐安英研究员, 浙江省农业科学院蚕桑研究所曹锦茹副所长, 山东省蚕业研究所于振诚博士, 广东农业科学院肖更生副院长, 西南大学家蚕基因库代方银博士和四川省农业科学院蚕业研究所张友洪副所长提供家蚕实验材料; 安徽农业大学徐家萍博士, 湖南省蚕桑科学研究所艾均文博士, 重庆师范大学王林玲博士, 苏州大学司马扬虎教授, 中国农业科学院蚕业研究所赵远博士, 西南大学蚕学与系统生物学研究所张泽教授和刘春博士, 重庆市蚕种管理总站蒋贵兵副站长, 四川省蚕业管理总站苏茂科硕士, 山东省平渡县丝绸公司冷伟站长及四川省农业科学院蚕业研究所胡祚忠研究员和李可贤主任收集提供野蚕材料, 在此一并致以最诚挚的谢意。

参 考 文 献 (References)

Arunkumar KP, Muralidhar M, Nagaraju J, 2006. Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkmoth, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 419 – 427.

Bandelt H, Forster P, Rohl A, 1999. Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 37 – 48.

Bradley DG, MacHugh DE, Cunningham P, Loftus RT, 1996. Mitochondrial diversity and the origins of the African and European cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5 131 – 5 135.

Chen LY, Zhao QL, Shen XJ, Zhang ZF, Tang SM, Xu AY, Zhang GZ, Guo XJ, 2007. Nucleotide sequences in the A + T rich regions of mitochondrial DNA from local races of *Bombyx mori* and their molecular evolution. *Acta Sericologica Sinica*, 33 (1): 5 – 13. [陈丽媛, 赵巧玲, 沈兴家, 张志芳, 唐顺明, 徐安英, 张国政, 郭锡杰, 2007. 家蚕地方品种线粒体基因组 A + T 丰富区的序列及分子进化分析. 蚕业科学, 33(1): 5 – 13]

Chen SY, Su YH, Wu SF, Sha T, Zhang YP, 2005. Mitochondrial diversity and phylogeographic structure of Chinese domestic goats. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 804 – 814.

Duan YY, 1983. Sericulture originated from the middle reaches of the Yellow River where the ancestors of Chinese people inhabited. *Acta Sericoligica Sinica*, 9(1): 50 – 56. [段佑云, 1983. 家蚕起源于黄河中游中华民族发祥地. 蚕业科学, 9(1): 50 – 56]

Excoffier L, Smouse PE, Quattor JM, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2): 479 – 491.

Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783 – 791.

Fu YX, 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915 – 925.

Giuffra E, Kijas JMH, Amarger V, Carlborg O, Jeon JT, Anderson L, 2000. The origin of the domestic pig: Independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*, 154: 1 785 – 1 791.

Guo F, 1987. On the origin of Chinese *Bombyx mori* based on the terra-cotta silkworm pupae unearthed in Zhengding South Village, Hebei. *Agricultural Archaeology*, 13(1): 302 – 309. [郭郛, 1987. 从河北省正定南庄出土的陶蚕蛹试论我国家蚕的起源问题. 农业考古, 13(1): 302 – 309]

Hiendleder S, Mainz K, Plante Y, Lewalski H, 1998. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two divergent ancestral maternal sources: No evidence for contributions from Urial and Argali sheep. *Heredity*, 89: 113 – 120.

Hua DG, 1996. Atlas of Diseases and Insect Pests in Silkworm and Mulberry. Shandong Science Publishing House, Jinan. 28 – 42. [华德公, 1996. 蚕桑病虫害原色图谱. 济南: 山东科学出版社. 28 – 42]

Huang ET, 1985. A study on the incubation of the over-wintering eggs and annual generation of the wild sikworm. *Acta Sericologica Sinica*, 11(4): 194 – 200. [黄尔田, 1985. 野蚕越冬卵的孵化和年发生代数的研究. 蚕业科学, 11(4): 194 – 200]

Jiang YL, 1982. The Origin and Differentiation of Domesticated Silkworms. Jiangsu Science and Technology Publishing House, Nanjing. 3 – 21. [蒋猷龙, 1982. 家蚕的起源和分化. 南京: 江苏科技出版社. 3 – 21]

Jiang YL, 1989. Advance of the study on the origin of silkworm and its differentiation. *Newsletter of Agriculture and Animal Husbandry*, (7): 43 – 47. [蒋猷龙, 1989. 家蚕的起源和分化研究进展. 农牧情报研究, (7): 43 – 47.]

Laurent E, Guillaume L, Stefan S, 2006. Arlequin ver3. 1: An

Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Berne, Baltzerstrasse 63012, Bern, Switzerland.

Li AL, Xu AY, Shen XJ, Tang SM, Zhang ZF, Pan SY, 2004. Analysis of segment sequences and molecular evolution between *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* using mitochondrial Cyt b gene. *Acta Sericologica Sinica*, 30(1): 80 – 84. [李爱玲，徐安英，沈兴家，唐顺明，张志芳，潘沈元，2004. 家蚕、野桑蚕线粒体 Cyt b 基因片段序列分析及分子进化研究. 蚕业科学，30(1): 80 – 84]

Li HW, 1985. Probing into the origin and voltismal variations of *Bombyx mandarina* and *Bombyx mori*. *Newsletter of Sericultural Science*, (1): 41 – 45. [李焕文，1985. 桑蚕与家蚕的起源及其化性变化的探索. 蚕学通讯，(1): 41 – 45]

Li ZG, Wu QY, 1983. The observational analyses of wild silkworm chromosomes. *Acta Sericologica Sinica*, 9 (1): 57 – 58. [李振刚，吴秋英，1983. 野蚕染色体的观察分析. 蚕业科学，9(1): 57 – 58]

Liu WJ, Liu NF, 2008. Population genetic structure of *Phasianus colchicus* strauchi based on mtDNA Cyt b genes. *Acta Zoologica Sinica*, 54 (2): 225 – 232. [刘文娟，刘迺发，2008. 基于线粒体 Cyt b 基因的雉鸡甘肃亚种的种群遗传结构. 动物学报，54 (2): 225 – 232]

Lu C, Yu HS, Xiang ZH, 2002a. Molecular systematic studies on Chinese mandarina silkworm (*Bombyx mandarina* M.) and domestic silkworm (*Bombyx mori* L.). *Scientic Agricultura Sinica*, 35(1): 94 – 101. [鲁成，余红仕，向仲怀，2002a. 中国野桑蚕和家蚕的分子系统学研究. 中国农业科学，35(1): 94 – 101]

Lu C, Zhao AC, Xiang ZH, Wan CL, 2002b. AFLP analysis of genetic diversity of *Bombyx mandarina* in China. *Zoological Research*, 23 (2): 166 – 172. [鲁成，赵爱春，向仲怀，万春玲，2002b. 中国野桑蚕遗传多样性的 AFLP 分析. 动物学研究，23(2): 166 – 172]

Lu C, Liu YQ, Liao SY, Li B, Xiang ZH, Han H, Wang XG, 2002c. Complete sequence determination and analysis of *Bombyx mori* mitochondrial genome. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 10 (2): 163 – 170. [鲁成，刘运强，廖顺尧，李斌，向仲怀，韩华，王学刚，2002c. 家蚕线粒体基因组全序列测定与分析. 农业生物技术学报，10(2): 163 – 170]

Lu C, Yu HS, Xiang ZH, 2002d. The genetic diversity and phylogenetic relationship of *Bombyx mandarina* and *B. mori* from China based on RAPD analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 45(2): 198 – 203. [鲁成，余红仕，向仲怀，2002d. 基于 RAPD 分析的中国野桑蚕和家蚕遗传多样性和系统发育关系研究. 昆虫学报，45(2): 198 – 203]

Peng WP, 1987. The morphological breeding of wild silkworm in China. *Newsletter of Sericultural Science*, (1): 48 – 53. [彭卫平，1987. 中国野桑蚕(*Bombyx mandaina*)性状的育种学研究. 蚕学通讯，(1): 48 – 53]

Rozas J, Sanchez, DelBarrio JC, Messeguer X, Roza R, 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2 496 – 2 497.

Savolainen P, Zhang YP, Luo J, Lundeberg J, Leitner T, 2002. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*, 298: 1 610 – 1 613.

Schneider S, Excoffer L, 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152: 1 079 – 1 089.

Shen WD, Wei ZG, Zhang YQ, Hu YT, Hamano K, 2001. Diversity of pupal development of Chinese and Japanese *Bombyx mandarina* Moore. *Acta Sericologica Sinica*, 27(4): 277 – 282. [沈卫德，卫正国，张雨青，胡雨亭，浜野国胜，2001 . 中日野桑蚕蛹期发育的多样性. 蚕业科学，27(4): 277 – 282]

Shen YQ, Yao YG, 1986. Occurrence patterns and measures for the prevention of *Bombyx mandarina*. *Jiangsu Sericulture*, (3): 31 – 33. [沈永泉，姚友根，1986. 野蚕发生规律与防治. 江苏蚕业，(3): 31 – 33]

Swofford DL, 2002. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), Version 4. 0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4. 0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1 596 – 1 599.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.*, 25: 4 876 – 4 882.

Wan CL, Zhu YF, Tan YD, 1999. Application of AFLP markers to detect genetic polymorphic loci in silkworm (*Bombyx mori*). *Biotechnology*, 9(5): 4 – 9. [万春玲，朱玉芳，谭远德，1999. AFLP 标记在研究家蚕遗传多态性方面的应用. 生物技术，9 (5): 4 – 9]

Wu W, 2006. Study of the Composition Properties and Molecular Evolution of Animal Mitochondrial Genomes Based on Bioinformatics Analysis. PhD Dissertation, Southwest University, Chongqing. [武伟，2006. 动物线粒体基因组组成与进化的生物信息学研究. 重庆：西南大学博士学位论文]

Xia QY, Guo YR, Zhang Z *et al*., 2009. Complete Resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*). *Science*, 326(5 951): 433 – 436.

Xia QY, Zhou ZY, Lu C, Xiang ZH, 1998. Molecular phylogenetic study on the radical differentiation of *Bombyx mori* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Acta Entomologica Sinica*, 41 (1): 32 – 40. [夏庆友，周泽扬，鲁成，向仲怀，1998. 家蚕不同地理品种分子系统学研究. 昆虫学报，41(1): 32 – 40]

Yang HL, 1982. The breeding and genetic trend of the crossing between domesticated silkworm and wild silkworm. *Science and Technology of Sericulture*, (2):1 – 4. [杨鹤楼,1982. 家蚕 × 野桑蚕育种和遗传趋势探索. 蚕桑科技，(2): 1 – 4]

Yang XZ, Jiang TQ, Fu XS, 1984. The comparison and evolution of some quantitative characters of *Bombyx mori* and *Bombyx mandarian*. *Newsletter of Sericultural Science*, (2): 42 – 58. [杨

希哲，蒋同庆，付锡三，1984. 家蚕与桑蚕(野)一些数量形质的比较与进化. 蚕学通讯，1984.(2)：42－58]

Yoshitake N，1966. The blood relationship of *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* based on the enzyme types. *Jap. Genet*., 41 (1)：259－267

Yoshitake N，Jiang YL，1987. Origin and differentiation of *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*，13 (3)：182－184.［吉武成美，蒋猷龙，1987. 家蚕的起源和分化. 蚕业科学，13(3)：182－184］

Yu HS，Lu C，Zhou ZY，Xiang ZH，2000. A preliminary study on DNA polymorphism of *Bombyx mandarina*. in China. *Acta Sericologica Sinica*，26 (2)：94－98.［余红仕，鲁成，周泽扬，向仲怀，2000. 中国野桑蚕 DNA 多态性研究初报. 蚕业科学，26(2)：94－98］

Zheng SY，1992. The Prevention of Mulberry Diseases and Insect Pests. 2nd ed. China Agricultue Press，Beijing. 185－191.［郑声镛，1992. 桑树病虫害防治学(第 2 版). 北京：农业出版社. 185－191］

Zhou KM，1982. Study on the origin of sericulture. *Agricultural Archaeology*，(1)：133－138.［周匡明，1982. 养蚕起源问题的研究. 农业考古，(1)：133－138］

（责任编辑:袁德成）